

結核の遺伝子薬剤感受性検査について

Genotypic drug susceptibility testing for tuberculosis

み た ら い さ と し
御 手 洗 聡
Satoshi MITARAI

はじめに

結核菌の薬剤感受性検査は、基本的に薬剤曝露に対する発育の有無を評価するものである。結核菌の発育速度に依存することから時間のかかるものであり、初回分離から全てを固形培地で実施すれば、2～3 か月は当たり前という時代もあった。2000 年代に入り、液体培地による薬剤感受性検査が一般化されるに至り、米国 CDC の推奨もあり、診断から 1 か月以内に薬剤感受性検査の結果を得ることが、適正な結核患者管理に必要とされるようになった¹⁾。

しかしながら、これらの要件はバイオハザード施設が整備された先進工業国でのみ可能なものであり、本来結核菌の迅速な薬剤感受性検査を必要としている結核高負担国（殆どが発展途上国）では望むべくもなかった。そこで培養検査を必要とせず、かつ迅速に結核菌の薬剤耐性を推定する方法として、遺伝子変異の検出法が開発され、導入されたのは理の当然と言える。振り返って先進工業国においても、臨床検体から薬剤感受性を推定可能な方法は、迅速かつ適正な結核患者管理に有用ということになり、ゲノム技術を利用して網羅的に耐性遺伝子変異を検出する検査法が導入されるに至っている。

今回、これらの自動化あるいは網羅解析技術に関して概説する。なお、世界的には様々な自動化技術が利用可能な状況にあるが、今回は基本的に日本国内で現状利用可能なものに限定する。

I. 日本で利用可能な耐性遺伝子変異 検出対象薬剤

現在、保険適用の範囲内で耐性遺伝子の検出が可能な薬剤は Rifampicin (RFP)、Isoniazid (INH) および Pyrazinamide (PZA) の 3 薬剤のみである。

結核菌におけるリファンピシンの作用標的は DNA 依存性 RNA polymerase であり、この酵素活性を阻害することにより結核菌の RNA 合成を抑制する。RNA polymerase のコアは 2 つの α 、1 つの β およびもう 1 つの β' -subunit からなる (四量体)。RFP 耐性の約 95% は結核菌 RNA polymerase の β -subunit をコードしている *rpoB* 遺伝子領域の一部 (Rifampicin Resistance Determining Region: RRDR) わずか 81bp に変異が見られる (変異のホットスポット)。PCR により増幅した *rpoB* 遺伝子の当該領域をシーケンスすれば変異の出現が同定できる。遺伝子変異によってモチーフが変化し、RFP の結合が弱まるため耐性が生じる。変異の出現頻度が高いのはコドン 450 や 445 であるが、コドン 430 や 435 にも変異が認められる。表現型試験で確認する必要はあるものの、前者の変異では RFP・Rifabutin (RBT) 共に耐性である場合が多く、後者では RFP 耐性・RBT 感受性が期待できる (disputed あるいは borderline mutation と呼ばれる変異)。世界保健機関 (WHO) は遺伝子変異による RFP 耐性推定に関して、信頼度別に表 1 のようなデータを示している²⁾。RFP 耐性を多剤耐性結核菌のサロゲート・マーカーとしている文献は多いものの、日本のように耐性率の低い地域では陽性適中率 (RFP 耐性が陽性である場合の多剤

表 1 結核菌における *rpoB* 変異の Rifampicin 耐性推定における信頼度

高信頼性変異	中信頼性変異	低信頼性変異
Q432K	D435Y	L430P
Q432L	S441L	H445N
Q432P	L452P	I491F
F433dupl		
D435A		
D435F		
D435G		
D435V		
S441Q		
H445C		
H445D		
H445G		
H445L		
H445R		
H445Y		
S450F		
S450L		
S450W		

(文献2)より抜粋し一部改変)

耐性結核菌である確率)は必ずしも高くない。RFP耐性結核が多い治療失敗例や外国出生者など、事前確率の高い対象で実施するのが効率的である。遺伝子変異の信頼性と関連して、WHOは従来のRFPの表現型薬剤感受性検査の基準濃度を1.0 µg/mLから0.5 µg/mLに変更した。これは前述のdisputed mutationにおいては、MICが比較的低値であっても再発率には差がないという報告に基づき、そのようなdisputed mutationでの「遺伝子検査上の耐性」と「表現型検査上の感受性」という齟齬を可能な限り減少させるのが目的である。

INH耐性機構は主に二つであり、*furA-katG*ある

いは*fabG1-inhA* オペロンの遺伝子変異に由来している。INHはプロドラッグであるため、活性体として作用するにはINHが結核菌のもつCatalase-peroxidase活性によってイソニコチン酸ラジカルとなり、pyridine nucleotide coenzymesであるNAD⁺やNADP⁺と結合してINH-NAD(P)になる必要がある。Catalase-peroxidase活性を持つ酵素(KatG)をコードしている*katG*遺伝子の変異によるCatalase-peroxidase酵素活性の低下は、INHの活性化を阻害し、耐性を誘導すると考えられる。実際によくみられるのは*katG*内部の点突然変異によるもので、頻繁にみられる変異はSer315Thrの変異である。Ser315Thrへの変異によりKatGの三次元構造が変化し、INHのアフィニティが低下することが示されている³⁾。

INHは細胞壁のミコール酸の生合成を阻害する。InhA蛋白(NADH dependent enoyl-ACP (acyl carrier protein) reductase)は脂肪酸の生合成に関与しており、この働きを前述のINHの代謝活性体が阻害していると考えられている。しかし、InhAの発現が過剰となれば、INHの効果は相対的に低下する⁴⁾。*inhA*のプロモーター部位の上流15bpにC→Tの変異が認められる場合が多く、比較的低MICのINH耐性株となる。表現型として感受性となる場合もあることが報告されている⁵⁾。

PZAはプロドラッグであり、基本的には結核菌が持っているピラジナミダーゼ(PZase)活性によってピラジニン酸(pyrazinoic acid: POA)となり、結核菌に作用すると考えられている(図1)⁶⁾。このPZaseをコードしているのが*pncA*と呼ばれる遺伝子であ

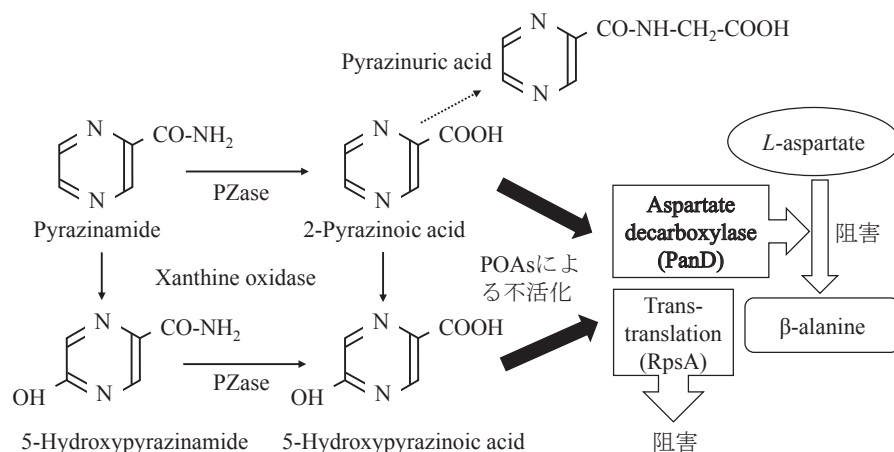


図 1 Pyrazinamide作用機序とMIC変動への影響

(文献6)を参考に作成)

り、約 560 bp の配列を持っている。この *pncA* あるいはその上流のプロモーター領域に変異あるいは欠損等が生じることにより、PZase 活性が低下して、間接的にピラジナミド耐性が生じると考えられている。*pncA* にはリファンピシン耐性における RRDR のようなホットスポットは認められず（いわゆる loss of function 変異）、図 2 に示すような多くの変異が報告されている⁷⁾。時に *pncA* 全体を含む大規模な欠失が認められることがあり、PZA 単剤耐性例で多い様に思われる。また、活性型の POA が RpsA に結合して Trans-translation を阻害するが、*rpsA* 変異も複数リストされている。

II. ラインプローブアッセイ

INH、RFP および PZA の各々について、ジェノスカラー INH TB II/Rif TB II/PZA TB II (ニプロ) が市販されている。簡単に言えば、ストリップ上に固定されている野生型あるいは変異型のプローブに、PCR によって増幅した結核菌の標的遺伝子が結合するか否か (DNA-DNA ハイブリッドの形成) によって、耐性あるいは感受性を判定する。野生型に結合し、変異型に結合がなければ感受性であり、野生型に結合しない、あるいは変異型に結合する場合は耐性と判断される。検査時間はおよそ 6 時間であり、PCR 増幅部分はマニュアルで行う必要があるが、ハイブリダイゼーション以降は自動装置が利

用可能である。PZA の遺伝子診断キットとしては本製品が唯一である。

III. セミオートマティック遺伝子変異検出装置

Xpert MTB/RIF (ベックマン・コールター) とコバス[®]MTB-RIF/INH (ロシュ・ダイアグノスティックス) の二つが保険適用にて利用可能である。

Xpert MTB/RIF は前述の *rpoB* (RRDR) を 5 本のプローブ (molecular beacon) で走査し、mutation や indel (insertion と deletion を併せた用語) を検出することで RFP 耐性を診断することができる。検体の前処理 (不活化と溶解) はマニュアルで行う必要があるが、処理後の検体をカートリッジに入れてモジュールにセットし、反応をスタートさせればカートリッジに全ての試薬が内蔵されているので、全て自動で工程が進行する。所要時間は 110 分とされており、結核菌の検出同定と RFP 耐性診断を同時に行うことができる。製品説明書によると、結核菌検出感度は 131 cfu/ml (95% CI; 106.2-176.4) とされている。塗抹陽性・培養陽性となる検体については感度 98% (95% CI, 97-99)、塗抹陰性・培養陽性の検体での検出感度は 68% (95% confidence interval [CI]: 59-75) とされている。リファンピシン耐性の診断精度は感度 94% (95% CI: 87-97)、特異度 98% (95% CI, 97-99) とされている⁸⁾。日本では 2017 年に保険収載されている。COVID-19 の検査のため多く

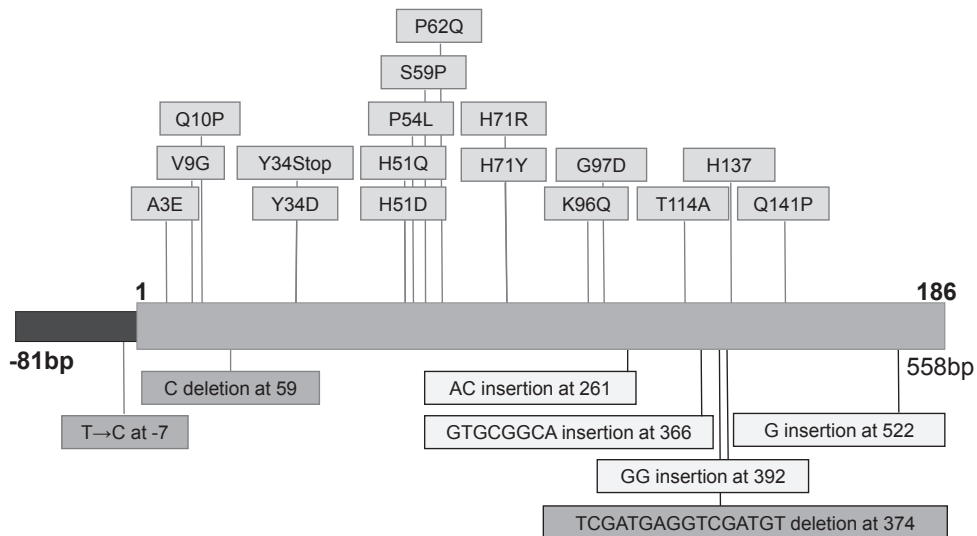


図 2 PZA 耐性菌での *pncA* 遺伝子上の変異分布の一例
(文献7)を参考に作成)

の施設で導入されており、結核菌検出への利用が期待される。また、日本では未承認であるが、結核菌検出能力を高めた Xpert MTB/RIF Ultra という新たなカートリッジが世界的には広く使用されている。

コバス[®]MTB-RIF/INH はコバス[®] 5800/6800/8800 システム上で使用することを目的とした体外診断用医薬品である。未処理あるいは NALC-NaOH 処理済みの喀痰を使用する。使用説明書によると、検体が生喀痰の場合 0.4 mL 以上、NALC 処理済み検体の場合 0.2 mL 以上容器に入っていることを確認し、Microbial Inactivation Solution (MIS) を 1:2 の割合 (生喀痰) または 1:5 の割合 (NALC-NaOH 処理済み検体) で加え、激しく振とうするか、30～60 秒ボルテックスし、その後 15～30℃ で少なくとも 60 分間インキュベートする。その後、完全にホモジナイズしてから軽くスピンドウン後開栓し、1.2～3.6 mL を耐熱性バーコードラベルが貼付された指定の 5 mL ポリプロピレンチューブに移し替え、キャップを閉じ、指定のチューブソニケーターを使用し、超音波処理を行う。3,000xG で 1 分間遠心し、前述のコバス[®] 5800/6800/8800 システム上で検査を実施する。基本的には INH 用プローブ 7 種と RFP 用プローブ 19 種による TaqMan アッセイである。日本国内で分離された結核菌株を元に作製した擬似喀痰検体を用いた評価によると、INH の感度と特異度は 77.8% (95% CI: 68.6-84.8) および 90.0% (95% CI: 69.9-97.2) となっている。同様に RFP の感度と特異度は 91.8% (95% CI: 83.2-96.2) および 93.5% (95% CI: 82.5-97.8) と報告されている⁹⁾。

コバス[®]MTB-RIF/INH は 2023 年 2 月に保険収載されている。結核菌群リファンピシン耐性遺伝子及びイソニアジド耐性遺伝子同時検出：ア) 結核菌群リファンピシン耐性遺伝子及びイソニアジド耐性遺伝子同時検出は、塗抹検査又はその他の検査所見で結核菌感染の診断が確定した患者を対象として、薬剤耐性結核菌感染を疑う場合に、本区分「20」ウイルス・細菌核酸多項目同時検出の所定点数を準用して算定する。イ) 結核菌群リファンピシン耐性遺伝子及びイソニアジド耐性遺伝子同時検出と本区分「19」の結核菌群リファンピシン耐性遺伝子検出及び結核菌群イソニアジド耐性遺伝子検出を併用した場合は、主たるもののみ算定する、となっている。「20」のウイルス・細菌核酸多項目同時検出には

963 点の保険点数が付与されている。2023 年 5 月から、一部の検査センターがコバス[®]MTB-RIF/INH の受託を開始している。

IV. 網羅的遺伝子変異検出法

臨床検体から直接網羅的に耐性遺伝子を検出する方法として、マルチプレックス PCR をベースとして標的遺伝子群を次世代シーケンサーでディープシーケンスする targeted next generation sequencing (tNGS) が市販されている (日本未承認)。フランスの Genoscreen 社が開発した Deeplex Myc-TB という体外診断用医薬品で、18 の薬剤耐性関連遺伝子群 (*rpoB*, *katG*, *fabG1*, *ahpC*, *inhA*, *pncA*, *embB*, *gidB*, *rpsL*, *gyrA*, *gyrB*, *ethA*, *eis*, *rrs*, *tlyA*, *rplC*, *rrl*, *rv0678*) を標的として、13 種の抗結核薬 (RFP, INH, PZA, Ethionamide, Ethambutol, Streptomycin, Kanamycin, Capreomycin, Amikacin, Fluoroquinolones, Linezolid, Bedaquiline, Clofazimine) の耐性を一度に解析できる。Illumina の short read sequencer を用いた amplicon deep sequence であるため、数千の非常に深い depth が得られる。結果として hetero-resistance (感受性菌と耐性菌の混在) が検出される機会が増えるが、どの程度の割合を占めていれば臨床的に耐性となるのかのブレイクポイントは現時点で不明である。われわれの施設では、研究目的で 50 例ほど喀痰からの直接感受性検査を実施しているが、塗抹陽性検体であれば概ね良好な結果が得られる。Mansoor らがムンバイの患者 148 名を対象に実施した Deeplex Myc-TB のデータが報告されているが、概ね表現型と一致している。ただし Clofazimine や Linezolid など耐性株が少なく、変異情報の信頼性が不確定なものについてはやはり感度が低い傾向である (表 2)¹⁰⁾。

おわりに

INH、RFP および PZA は現在でも主要な抗結核薬であり、これらの薬剤に対する耐性を有する結核菌は治療困難な対象となりうる。特に RFP に対する耐性の有無によって、治療期間・内容ともに大きく変化する。INH も殺菌性の高い薬剤であり、RFP と INH の両方の耐性を迅速に診断可能となったこと

表 2 Deeplex Myc-TB による臨床検体での評価

Drug	Including uncharacterized variants		Excluding uncharacterized variants	
	Sensitivity % (95% CI)	Specificity % (95% CI)	Sensitivity % (95% CI)	Specificity % (95% CI)
INH	99.2 (95.8-99.9)	93.2 (71.7-98.9)	99.2 (95.8-99.9)	93.2 (71.7-98.9)
RFP	100.0 (97.0-100)	56.6 (37.0-73.3)	100.0 (97.0-100)	56.6 (37.0-73.3)
EB	100.0 (96.4-100)	56.8 (42.4-70.3)	100.0 (95.9-100)	56.8 (42.4-70.3)
PZA	88.6 (81.1-93.3)	95.2 (84.2-98.7)	88.2 (80.5-93.1)	95.2 (84.2-98.7)
SM	98.2 (93.8-99.5)	91.2 (77.0-97.0)	98.2 (93.7-99.5)	91.2 (77.0-97.0)
FQ	95.7 (89.4-98.3)	98.2 (90.6-99.7)	95.7 (89.4-98.3)	98.2 (90.6-99.7)
KM	65.6 (48.3-79.6)	97.3 (92.4-99.1)	63.3 (45.5-78.1)	97.3 (92.4-99.1)
AMK	87.5 (64.0-96.5)	100.0 (97.1-100)	87.5 (64.0-96.5)	100.0 (97.1-100)
CPM	64.3 (38.8-83.7)	93.7 (88.1-96.8)	61.5 (35.5-82.3)	93.7 (88.1-96.8)
TH	79.7 (69.7-87.1)	95.5 (87.6-98.5)	75.4 (63.7-84.2)	95.5 (87.6-98.5)
LZD	50.0 (15.0-85.0)	99.3 (96.2-99.9)	50.0 (15.0-85.0)	99.3 (96.2-99.9)
CFZ	33.3 (9.7-70)	96.8 (90.1-98.0)	33.3 (9.7-70)	96.8 (90.1-98.0)

(文献10)より引用)

の意義は大きい。PZAをはじめとする他の薬剤に追加の耐性を作らないよう、両薬剤に耐性の疑いのある患者には積極的に利用することが勧められる。

文 献

- Shnnick TM, Iademarco MF, Ridderhof JC. National Plan for Reliable Tuberculosis Laboratory Services Using a Systems Approach. MMWR. 2005; **54** (RR06): 1-12.
- Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/deed.en>) (2023/7/31 確認)
- Mo L, Zhang W, Wang J, et al. Three-dimensional model and molecular mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and isoniazid-resistant KatG mutants. Microb Drug Resist 2004; **10** (4): 269-279.
- Musser JM, Kapur V, Williams DL, et al. Characterization of the catalase-peroxidase gene (katG) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. Journal of Infectious Disease 1996; **173** (1): 196-202.
- Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, et al. Biological and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with low-level resistance to isoniazid in Japan. J Clin Microbiol. 2008; **46** (7): 2263-2268.
- Sheen P, Lozano K, Gilman RH, et al. *pncA* gene expression and prediction factors on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis 2013; **93** (5): 515-522.
- Aono A, Chikamatsu K, Yamada H, et al. The association between *pncA* gene mutations, pyrazinamidase activity and pyrazinamide-susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobiol Agent Chemother 2014 Aug; **58** (8): 4928-4930.
- Steingart KR, Sohn H, Schiller I, et al. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. Cochrane Database Syst Rev. 2013 Jan **31**; (1): CD009593.
- Aono A, Murase Y, Minegishi M, et al. Clinical evaluation of the cobas® MTB-RIF/INH reagent and the cobas® 6800 for the detection of isoniazid and rifampicin resistance. Tuberculosis. 2022 May; **134**: 102199.
- Mansoor H, Hirani N, Chavan V, et al. Clinical utility of target-based next-generation sequencing for drug-resistant TB. Int J Tuberc Lung Dis. 2023 Jan 1; **27** (1): 41-48. Licence:CC BY 4.0 IGO. (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.en>) (2023/7/31 確認)